1. Sinonímia

VIDAS CMV IgM.

2. Aplicabilidade

Aos bioquímicos do setor de imunologia.

3. Aplicação clínica

O CMV IgM pelo método ELFA é utilizado como teste confirmatório para os resultados positivos do CMV IgM CMIA Architect.
O citomegalovírus faz parte da família dos herpes vírus. Apesar de estar presente em 60 a 85% da população é, geralmente, assintomático, podendo causar patologias graves tanto na criança como no adulto. O CMV pode permanecer durante anos no organismo, causar infecções recorrentes ou ser transmitido a outras pessoas.
De 1 a 3 % das mulheres são contaminadas durante a gravidez e em metade destes casos a infecção é transmitida ao feto. Geralmente assintomática, em cerca de 5% destes casos as conseqüências são muito graves causando hepato-esplenomegalia, hidrocefalia, microcefalia, prematuridade e, freqüentemente, morte fetal. Mesmo quando assintomática, aproximadamente 10% das crianças apresentam seqüelas neuro-sensoriais como surdez e cegueira parcial ou total.
O CMV pode também causar infecção severa nos imunodeprimidos (HIV, transplantados).
A detecção das IgM anti-CMV é útil no diagnóstico das infecções primárias recentes, principalmente em mulheres grávidas.
As IgM anti-CMV estão presentes em 70% das primo-infecções, persistem, em geral, de 16 a 20 semanas e podem reaparecer, de forma inconstante, nas reativações.

4. Princípio do teste

O princípio do doseamento associa o método imunoenzimático Sandwich em duas etapas com uma determinação final em fluorescência (ELFA). O cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de sistema de pipetagem. Os outros reagentes estão prontos para uso e pré-repartidos na barrete. Todas as etapas do teste são efetuadas, automaticamente, no aparelho e são constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e dispensação do meio reacional.
Após uma etapa de adsorsão das IgG e do fator reumatóide, a amostra é aspirada e dispensada no interior do cone durante um tempo determinado. As IgM anti-CMV da amostra vão fixar-se ao antígeno CMV fixado no interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados.

Um Ac monoclonal anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina é aspirado e dispensado no interior do cone ligando-se às IgM anti-CMV humanas fixadas na parede do cone A última lavagem elimina os componentes não fixados.

Na etapa final de revelação, o substrato (4-Metil- umbeliferil-fosfato) é aspirado e depois dispensado pelo cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise do substrato num produto (4- Metil-umbeliferona) cuja fluorescência é medida em 450 nm. O valor do sinal de fluorescência emitida é proporcional a concentração de anticorpos presente na amostra. Terminado o teste os índices de CMV IgM são calculados, automaticamente, pelo aparelho em relação a um calibrador S1 memorizado e depois impressos.

5. Amostra

5.1 Preparo do paciente
Jejum não necessário.

5.2 Tipo de amostra
Soro.
Soros inativados, muito lipêmicos, hemolisados, ictéricos ou mal identificados são inadequados para uso.

5.3 Colheita
Observar as precauções universais para punção venosa.
Quantidade mínima de sangue: 1ml
Quantidade ideal de sangue: 3ml

5.4 Preservação e transporte
As amostras são estáveis por 5 dias refrigeradas a 2-8 ^{0}C. Para o transporte observar as normas de segurança legais.

5.5 Identificação da amostra
Etiqueta com código de barras gerada pelo sistema de gerenciamento de dados do LAC.

5.6 Armazenamento
Para o armazenamento por períodos superiores a 5 dias congelar a –25^{0}C $\pm$ 6^{0}C.

6. Reagentes e materiais

Reagentes do kit
Cones: cones sensibilizados com antigeno CMV (Cultura celular de vírus)
Barretes: descrição dos poços e respectivos reagentes

1 -poço-amostra
2 -Adsorvente das IgG e do fator reumatóide (soro de cabra anti-IgG humana)
3 -Adsorvente das IgG e do fator reumatóide (soro de cabra anti-IgG humana)
4 -tampão de pré-lavagem: TRIS

5-7-8-9 -tampão de lavagem: TRIS
6 -conjugado: anticorpo monoclonal anti-IgM humanas (rato) marcado com fosfatase alcalina
10 -cubeta de leitura com substrato: 4-metil-umbeliferil fosfato

Controles:
Controle Positivo (C1) -soro humano contendo IgM anti-CMV com índice conhecido
Controle Negativo (C2) -soro humano negativo para IgM anti-CMV
Calibrador:
Calibrador (S1) soro humano contendo IgM anti-CMV
Cartão MLE: ficha de especificações que contém os dados de fabrico necessários a calibração do teste

6.1 Preparo

Prontos para uso

6.2 Estabilidade

Estáveis até a data de vencimento.

6.3 Armazenamento

Em refrigerador a 2-8°C

7. Equipamentos

MINAS-VIDAS, Centrífuga e pipetas automáticas.

8. Calibração

Procedimento:
Leitura automática da Curva Master (Cartão MLE):
A partir do "Menu Principal" selecionar a opção "Menu de Calibração" e "Ler curva de Calibração".
Colocar o cartão MLE na bandeja própria e inserir no aparelho.
Selecionar a seção na qual o mesmo foi inserido (A ou B).
A leitura será feita automaticamente.
Ao terminar, o equipamento retornará ao "Menu de Calibração".
Introdução manual da Curva Master:
Caso a leitura automática do cartão MLE não seja possível, selecionar a opção "Introdução Manual da Curva de Calibração", digitar todos os números e letras contidas nas posições 1 a 16 do cartão e teclar "enter" após cada informação completada.
Para solicitar a calibração selecionar no Menu Principal, "Inicialização com Identificação", o segmento a ser utilizado (A ou B), colocar os barretes e cones nas posições de 1 a 4 e digitar o número 1, a letra S , 1 novamente e "Enter", a tela passará, automaticamente, a segunda posição do segmento, teclar novamente S 1 "Enter", C 1 "Enter" e C 2 "Enter". Voltar a tela

anterior, homogeneizar e pipetar 100µl do calibrador S1 e dos controles C1 e C2 nas respectivas posições e teclar “Inicialização”. Ao final, os resultados da calibração são impressos automaticamente. O valor do calibrador S1, analisado em duplicata e dos controles (C1 e C2) devem ficar dentro do “range” de aceitação definidos no cartão MLE.
O procedimento, acima descrito, deve ser repetido na troca de lote e sempre que houver rotina após o vencimento da calibração (validade da calibração é de14 dias).

9. Procedimento (passo a passo)

Retirar da geladeira, somente, os reagentes necessários(cones e barretes), deixar atingir a temperatura ambiente. Retornar o kit a geladeira tendo o cuidado de fechar bem a embalagem dos cones.
Programar os testes selecionando no Menu Principal “Inicialização com Identificação” o segmento utilizado (A ou B), nas posições de 1 a 6 do segmento identificar as amostras usando para isso o teclado alfa-numérico dando “Enter” após cada dado introduzido ou ainda utilizar o scanner de leitor de código de barras para a identificação.
Colocar no aparelho os cones e barretes.
Homogeneizar bem as amostras.
Distribuir 100µl de cada amostra no poço-amostra respectivo.
Voltar a tela anterior e teclar “Inicialização”
Ao término do ensaio os resultados serão impressos automaticamente
Para maiores detalhes consultar o Manual de Utilização MINI-VIDAS.

10. Controle de qualidade

10.1 Interno
Controles Positivo e Negativo fornecidos pelo kit;
Devem ser utilizados a cada troca de lote e sempre que houver rotina após o vencimento da calibração.
Registrar os resultados na planilha de controles;
Valores não aceitáveis:
- repetir os controles;
- novamente fora do esperado proceder recalibração do kit e repetir os controles;
- novamente fora, descartar o kit e/ou controles.

10.2 Externo
Vide tabela PCIQ/PAEQ.

11. Resultados

11.1 Unidades

Os resultados são expressos em índice.

11.2 Cálculos

O aparelho efetua duas medidas de fluorescência na cubeta de leitura para cada teste. A primeira leitura corresponde ao branco, a segunda é efetuada após incubação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo do RFV (Relative Fluorescence Value) é o resultado da diferença das duas medidas. O aparelho calcula para cada amostra um índice (resultado) que é a relação entre o seu RFV e o do calibrador (S1) memorizado.

11.3 Critérios de aceitação

Os controles devem apresentar valores aceitáveis para a liberação dos demais resultados conforme range próprio estabelecido a cada lote de reagente. Se o valor dos controles se afastar dos valores esperados, os resultados não podem ser validados.
O intervalo de aceitabilidade do Controle Interno é a consistência dos resultados.

12. Valores de referência

Negativo <0,70
Equívoco 0,70 a 0.89
Positivo >0,89

13. Valores críticos

Não se aplica.

14. Especificações de desempenho

Sensibilidade: 90,24%
Especificidade: 99,41%
Especificidade em amostras potencialmente interferentes: 98,72%

15. Fontes Potenciais de Variabilidade

Pode ser detectada interferência soros contendo anticorpos dirigidos contra componentes do reagente. Pacientes imunodeprimidos a detecção das IgM anti-CMV pode ser difícil, portanto o diagnóstico, nestes casos, não deve se basear unicamente nesta dosagem.

16. Limitações do método

Anticorpos dirigidos contra componentes do reagente podem interferir no resultado.

Em pacientes imunodeprimidos o diagnóstico da infecção por citomegalovírus não deve ser baseada, somente, no doseamento do anti-CMV IgM, visto que sua detecção pode ser difícil nestes casos.
Amostras provenientes de sangue de cordão não são validadas.

17. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados deve levar em conta o quadro clínico e o resultado de outros testes e métodos de doseamento (IgG anti-CMV, DNA viral, cultura viral...).

18. Biossegurança

Obedecer as normas de segurança vigentes no laboratório e usar equipamentos de proteção individual.

19. Anexos

Planilhas de controle interno (Anexo 18).

20. Bibliografia

Bula do teste, Manual MINI-VIDAS.